

УДК 616-002.3:544.77.022(063):616-006

ВОЗМОЖНОСТИ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ ХИТОЗАНА И НАНОЧАСТИЦ МЕТАЛЛОВ В РЕГЕНЕРАЦИИ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫХ РАН

Гладкова Е.В., Бабушкина И.В., Белова С.В., Мамонова И.А.,
Карякина Е.В., Конюченко Е.А.

ФГБУ «Саратовский научно-исследовательский институт травматологии и ортопедии»
Минздрава России, Саратов, e-mail: gladckowa.katya@yandex.ru

В эксперименте на 60 беспородных белых крысах-самцах сформирована модель экспериментальной полнослойной кожной раны, инфицированной клиническими и музейным № 754 штаммами *Staphylococcus aureus*. Изучены особенности метаболических, бактериологических, планиметрических показателей животных, динамика регенерации ран в зависимости от типа возбудителя. У экспериментальных животных выявлены определенные метаболические изменения, заключающиеся в интенсификации процессов перекисного окисления липидов и несостоятельности антиоксидантной системы, а также структурные нарушения при регенерации раневой поверхности, более выраженные в группе животных с раной, инфицированной клиническими штаммами *St. aureus*. Оценены регенераторные и антибактериальные свойства комплексного препарата, содержащего наночастицы меди и цинка и природный биополимер хитозан в условиях полнослойной гнойной раны, инфицированной музейным и клиническими штаммами *St. aureus*. Выявлено положительное воздействие препарата на нормализацию метаболического статуса, сокращение сроков эпителизации и формирование полноценных соединительнотканых структур при отсутствии вторичного инфицирования.

Ключевые слова: раневые покрытия, хитозан, наночастицы меди и цинка, регенерация экспериментальных ран, клинические метциллинрезистентный и музейный штаммы *St. aureus*

CAPABILITIES OF USE OF CHITOSAN AND METAL NANOPARTICLES IN REGENERATION OF EXPERIMENTAL WOUNDS

Gladkova E.V., Babushkina I.V., Belova S.V., Mamonova I.A.,
Karyakina E.V., Konjuchenko E.A.

Federal Government-Financed Institution «Saratov Research Institute
of Traumatology and Orthopaedics» of Ministry of Public Health and Social Development
of the Russian Federation, Saratov, e-mail: gladckowa.katya@yandex.ru

In the experiment with 60 outbred white male rats a model of an experimental full-layer skin wound infected with clinical and museum № 754 polyantibiotic strains *Staphylococcus aureus* was made. Characteristics of metabolic, bacteriological, planimetric indices of the animals, dynamics of wound regeneration according to an agent type were studied. In the experimental animals particular metabolic changes consisting in the intensification of lipid peroxidation processes and inconsistency of the antioxidant system and also structural abnormalities in the process of wound surface regeneration more evident in the group of animals with wounds infected with clinical strains *St. aureus* were detected. Regenerative and antibacterial properties of the complex preparation containing copper and zinc nanoparticles and natural biopolymer chitosan in conditions of a full-layer purulent wound infected with museum and clinical strains *St. aureus* were assessed. A beneficial impact of the preparation on the normalization of the metabolic status, reduction of the epithelization period and formation of full-blown connective-tissue structures in the absence of the secondary infection were observed.

Keywords: wound covering, chitosan, copper and zinc nanoparticles, methicillin-resistant and museum strain *Staphylococcus aureus*

Разработка в эксперименте раневых покрытий для заживления повреждений, вызванных различными механическими, термическими и другими факторами (гноино-воспалительными, дистрофическими процессами и др.) является актуальной научно-практической задачей [6].

Использование раневых покрытий, отличающихся отсутствием токсичности, способностью к биодеградации и высокой эффективностью в лечении гноино-воспалительных заболеваний позволяет воздействовать на метаболический дисбаланс в тканях при сохранении активности факторов регенерации.

Пристальное внимание уделяется покрытиям на основе хитозана, обладающе-

го помимо широкого спектра биологических свойств высокой биосовместимостью и биodeградируемостью [5, 9]. Немаловажным фактором являются антибактериальные свойства данного природного полимера [3, 7].

Исследование свойств наночастиц металлов показало их ранозаживляющую активность, регенерирующие и бактерицидные свойства, что делает перспективным их использование для лечения гноино-воспалительных осложнений в составе раневых покрытий. Биологически активные наночастицы металлов обладают пролонгированным действием из-за наличия на их поверхности защитного оксидного или гидроксидного слоя, предотвращающего бы-

строе растворение металла и образование многочисленных, продолжительно действующих очагов ионов [8, 10].

Цель работы: оценка влияния комплексного препарата на основе хитозана и наночастиц металлов на репаративную регенерацию в условиях полнослойной гнойной раны, инфицированной музейным и клиническим штаммами *Staphylococcus aureus*.

Материалы и методы исследования

В исследование применялся комплексный препарат (заявка № 2012119622 приор. от 16.05.12 г. – положительное решение на выдачу патента 21.01.2013 г.), состоящий из нанопорошков меди и цинка, полученных с помощью плазменной технологии, основанной на испарении сырья до частиц ультрадисперсного размера в плазменном потоке с температурой 5000–60000 К, а также хитозана пищевого (качество соответствует ТУ 9289-067-00472124-03, произведенного ЗАО «БИОПРОГРЕСС», г. Москва).

Объектом исследования явились 60 белых крыс-самцов, весом 130–140 г, у которых формировали полнослойную кожную рану размером 20×20 мм в межлопаточной области. Рану инфицировали музейным штаммом № 254658 *S. aureus* (MRSA) NCTC 13373/ATCC 43300 и клиническим метициллинрезистентным штаммом *S. aureus* № 754, выделенным от больного травматолого-ортопедического профиля.

Животные были разделены на 4 группы по 15 крыс в каждой:

1 группа (сравнения) – крысы с полнослойной кожной раной, инфицированной клиническими штаммами *St. aureus*, рана заживала естественным путем;

2 группа (опытная) – крысы с полнослойной кожной раной, инфицированной клиническими штаммами *St. aureus*, получавшие лечение комплексным препаратом;

3 группа (сравнения) – крысы с раной, инфицированной музейными штаммами *St. aureus*, рана заживала естественным путем;

4 группа (опытная) – животные, инфицированные музейными штаммами *St. aureus*, получавшие лечение комплексным препаратом.

Для оценки эффективности лечения использовали экспериментальные, планиметрические, цитологические, гистологические, микробиологические, биохимические и статистический методы.

Бактериологическое исследование гнойной раны включало количественное изучение раневой микрофлоры в динамике на 1-е, 3-и, 5-е, 7-е, 14-е сутки лечения. Гистологическую оценку тканей раневой поверхности производили с использованием окрашивания препаратов альциановым синим для выявления кислых гликозаминогликанов и по Маллори трихром для выявления коллагена. Интенсивность процессов эпителизации оценивали с помощью морфометрических измерений толщины эпидермиса с использованием окуляр-микрометра. Биохимические исследования включали в себя определение показателей липопероксидации (содержание малонового диальдегида (МДА) в сыворотке крови экспериментальных животных [2] и антиоксидантной защиты (активность церулоплазмينا [1, 4].

Статистическую обработку полученных данных проводили с помощью программы «Statistica 6.0»,

предназначенной для оценки результатов медицинских и биологических наблюдений, с вычислением средней арифметической (M), среднеквадратического отклонения (σ), средней ошибки средней арифметической (m), коэффициента достоверности (t), показателя вероятности (p).

Результаты исследования и их обсуждение

Формирование гнойного процесса обеспечивали путем внесения 1 мл суспензии *S. aureus* в количестве $1 \cdot 10^9$ КОЕ/мл на раневую поверхность. Через 3 суток отмечали характерные местные проявления и изменения картины периферической крови, наличие в ране монокультуры золотистого стафилококка при отсутствии другой сапрофитной флоры.

Нанесение комплексного препарата осуществляли однократно на область раны из расчета 1 г на 400 мм^2 поверхности.

Во 2-й (опытной) группе уже к 3-м суткам с момента начала лечения происходило снижение обсемененности ран по сравнению с группой животных, не получавших лечения, бактериальная флора была представлена монокультурой *S. aureus*. Под влиянием препарата происходило более динамичное заживление экспериментальной раны, чем у животных группы сравнения. К 7-м суткам с начала лечения рана полностью очищалась от возбудителя. В то же время у крыс 1 группы (сравнения) рана оставалась инфицированной *S. aureus* до 21-х суток ($3 \cdot 10^3$ КОЕ/г). Кроме того, у 6 животных отмечалось вторичное инфицирование – высевалась *Escherichia coli* в количестве $6 \cdot 10^5$ КОЕ/мл (табл. 1).

Во 4-й (опытной) группе нанесение комплексного препарата на инфицированную раневую поверхность также приводило к снижению бактериальной обсемененности, начиная с 3-х суток с начала лечения в отличие от показателей в 3-й группе сравнения. У крыс 4-й опытной группы отмечено прекращение бактериального роста также на 7-е сутки. В 3-й группе сравнения у животных, инфицированных музейным штаммом, в отличие от 1-й группы сравнения отмечено прекращение бактериального роста уже на 16-е сутки с начала наблюдений. Вторичного инфицирования не отмечено. При бактериологических исследованиях у крыс 3-й группы на всем протяжении наблюдения выделена только монокультура *S. aureus*, другой сапрофитной флоры не обнаруживали.

Исследованы биохимические показатели сыворотки крови крыс на 7-е сутки с начала лечения. Было обнаружено снижение уровня МДА и активности церулоплазмينا

в опытной группе по сравнению с группой животных без лечения. Причем выявленные изменения имели более выраженную динамику в опытной группе животных, инфицированных музейными штаммами по сравнению с опытной группой, инфицированной клиническими штаммами. Та

же направленность изменений биохимических параметров наблюдалась и в группе сравнения. Под воздействием комплексного препарата происходила постепенная нормализация показателей, что было более выражено в группе, инфицированной музейным штаммом (табл. 2).

Таблица 1

Количественное определение микроорганизмов на 1 г ткани у экспериментальных животных (КОЕ/г, $M \pm m$)

Серии экспериментов	1-е сутки	3-и сутки	5-е сутки	7-е сутки
Группа 1 ($n = 15$)	$(5,8 \pm 1,3) \cdot 10^6$	$(7,1 \pm 2,1) \cdot 10^8$	$(2,4 \pm 1,7) \cdot 10^9$	$(7,3 \pm 3,0) \cdot 10^8$
Группа 2 ($n = 15$)	$(6,0 \pm 1,4) \cdot 10^6$	$(4,1 \pm 2,5) \cdot 10^2$ $p < 0,001$	$(5,9 \pm 1,4) \cdot 10^2$ $p < 0,001$	Роста нет
Группа 3 ($n = 15$)	$(5,3 \pm 2,1) \cdot 10^6$	$(6,9 \pm 1,8) \cdot 10^6$	$(2,0 \pm 1,3) \cdot 10^5$	$(6,9 \pm 2,8) \cdot 10^3$
Группа 4 ($n = 15$)	$(6,2 \pm 1,5) \cdot 10^6$	$(5,1 \pm 2,3) \cdot 10^2$ $p < 0,001$	$(5,3 \pm 1,1) \cdot 10^1$ $p < 0,001$	Роста нет

Примечание: p – разница показателей в группе сравнения и соответствующей опытной группе.

Таблица 2

Биохимические показатели МДА и ЦП в сыворотке крови экспериментальных животных на 7-е сутки наблюдения

Показатель	Животные, инфицированные клиническими штаммами <i>St. aureus</i>		Животные, инфицированные музейным штаммом <i>St. aureus</i>	
	Группа 2	Группа 1	Группа 4	Группа 3
Активность церулоплазмينا	$21,79 \pm 0,47$ $p < 0,001$	$18,8 \pm 0,52$	$24,03 \pm 0,46$ $p < 0,001$	$19,78 \pm 0,55$
Содержание МДА	$3,38 \pm 0,16$ $p < 0,05$	$3,94 \pm 0,11$	$3,01 \pm 0,09$ $p < 0,01$	$3,55 \pm 0,14$

Примечание: p – разница показателей в группе сравнения и соответствующей опытной группе.

Морфометрическое изучение характеристик раневой поверхности на 10-е сутки демонстрировало увеличение толщины эпидермиса на 42% у животных опытных групп, инфицированных клиническим штаммом, и на 53% – музейным штаммом по сравнению с соответствующими группами, не получавшими лечения. В эпидермисе обеих опытных групп наблюдалось упорядоченное расположение кровеносных сосудов в отличие от групп сравнения. Кроме того, в участках активного кровообращения отмечена выраженная пролиферация фибробластов у животных, инфицированных клиническим штаммом.

На 21-е сутки наблюдения у животных обеих опытных групп отмечено формирование полноценных кожных структур со сформированными салными железами, тогда как в группах сравнения происходило образование рубцовой ткани, характеризующейся накоплением сульфатированных

гликозаминогликанов. Структурные компоненты соединительной ткани зоны раны у животных опытных групп были представлены зрелым коллагеном, расположенным горизонтально. У крыс групп сравнения в те же сроки отмечено наличие участков метахромазии, коллагеновые волокна расположены хаотично, реже – вертикально по ходу сосудов.

Заключение

Таким образом, клинические штаммы *St. aureus* приводят к более выраженным метаболическим и структурным изменениям, чем музейный штамм данного возбудителя. Комплексный препарат на основе хитозана и наночастиц меди и цинка проявляет выраженный антибактериальный эффект при использовании в условиях экспериментальной раны, инфицированной клиническими штаммами *St. aureus*, кроме того, способствует нормализации биохимических пока-

зателей липопероксидации, сокращает сроки заживления инфицированных ран.

Выводы

Разработанный комплексный препарат на основе наночастиц меди и цинка и хитозана эффективен в отношении экспериментальных ран, инфицированных как музейным, так и клиническими штаммами *St. aureus*.

Список литературы

1. Колб В.Г., Камышников В.С. Клиническая биохимия (пособие для врачей-лаборантов). – Минск: Беларусь, 1976. – 311 с.
2. Коробейникова Э.Н. Модификация определения продуктов перекисного окисления липидов в реакции с тиобарбитуровой кислотой // Лаб. дело. – 1989. – № 7. – С. 8–10.
3. Куликов С.Н. Исследование бактерицидных свойств хитозана // Рыбпром. – 2010. – № 2. – С. 36–41.
4. Пишак В.П., Ярмольчук Г.М. Материал для осуществления внешнего контроля качества определения церулоплазмينا // Клин. лаб. диагностика. – 1998. – № 4. – С. 38–44.
5. Скрыбин К.Г., Вихорева Г.А., Варламов В.П. Хитин и хитозан: получение, свойства и применение. – М.: Изд-воНаука, 2002. – 368 с.
6. Шаповалов С.Г. Современные раневые покрытия в комбустиологии // ФАР-Миндекс-практик. – 2005. – № 8. – С. 38–46.
7. Lim S.H., Hudson S.M. Review of chitosan and its derivatives as antimicrobial agents and their uses as textile chemicals // J. Macromol. Sci. – 2003. – Vol. 43, № 2. – P. 223–269.
8. Singh M., Singh S., Prasad S., Gambhir I.S. Nanotechnology in medicine and Antibacterial Effect of Silver Nanoparticles // Digest Journal of Nanomaterials and Biostructures. – 2008. – Vol. 3, № 3. – P. 115–122.
9. Van Sprang P.A., Janssen C.R. Toxicity identification of metals: development of toxicity identification fingerprints // Environmental Toxicology and Chemistry. – 2001. – Vol. 20, № 11. – P. 2604–2610.
10. Weir E., Lawlor A., Whelan. A., Regan F. The use of nanoparticles in anti-microbial materials and their characterization // Analyst. – 2008. – Vol. 133, № 7. – P. 835–845.

References

1. Kolb V.G., Kamyshnikov V.S. Klinicheskaya bioimiya (posobie dlya vrachej-laborantov). Minsk: Belarus', 1976. 311 p.
2. Korobejnikova E'.N. Modifikaciya opredeleniya produktov perekisnogo okisleniya lipidov v reakcii s tiobarbiturovoj kislotoj // Lab. delo. 1989. no. 7. pp. 8–10.
3. Kulikov S.N. Issledovanie baktericidnyx svojstv xitozana // Rybprom. 2010. no. 2. pp 36–41.
4. Pishak V.P., Yarmolchuk G.M. Material dlya osushestvleniya vneshnego kontrolya kachestva opredeleniya ceruloplazmina // Klin. lab. diagnostika. 1998. no. 4. pp. 38–44.
5. Skryabin K.G., Vixoreva G.A., Varlamov V.P. Xitin i xitozan: poluchenie, svojstva i primenenie. M.: Izd-voNauka, 2002. 368 p.
6. Shapovalov S.G. Sovremennye ranevye pokrytiya v kombustiologii // FAR-Mindeks-praktik. 2005. no. 8. pp. 38–46.
7. Lim S.H., Hudson S.M. Review of chitosan and its derivatives as antimicrobial agents and their uses as textile chemicals // J. Macromol. Sci. 2003. Vol. 43, no. 2. pp. 223–269.
8. Singh M., Singh S., Prasad S., Gambhir I.S. Nanotechnology in medicine and Antibacterial Effect of Silver Nanoparticles // Digest Journal of Nanomaterials and Biostructures . 2008. Vol. 3, no. 3. pp. 115–122.
9. Van Sprang P.A., Janssen C.R. Toxicity identification of metals: development of toxicity identification fingerprints // Environmental Toxicology and Chemistry. 2001. Vol. 20, no. 11. pp. 2604–2610.
10. Weir E., Lawlor A., Whelan. A., Regan F. The use of nanoparticles in anti-microbial materials and their characterization // Analyst. 2008. Vol. 133, no. 7. pp. 835–845.

Рецензенты:

Девдериани З.Л., д.м.н., профессор, зав. лабораторией иммунодиагностики, ФКУЗ «Российский научно-исследовательский противочумный институт «Микроб», г. Саратов;

Гладилин Г.П., д.м.н., профессор, зав. кафедрой КЛД, ГБОУ ВПО «СГМУ им. В.И. Разумовского» Минздрава России, г. Саратов.

Работа поступила в редакцию 19.06.2013.